

急性胃粘膜病変発症時の血管内皮障害発現機構と予防に関する研究 -5 lipoxygenase代謝に対するビタミンEの役割について-

著者	結城 豊彦
号	1109
発行年	1992
URL	http://hdl.handle.net/10097/20613

氏 名 (本籍)

ゆう き とよ ひこ
結 城 豊 彦

学位の種類

博 士 (医 学)

学位記番号

医 博 第 1109 号

学位授与年月日

平成 4 年 3 月 27 日

学位授与の条件

学位規則第4条第1項該当

研究科専攻

東北大学大学院医学研究科
(博士課程) 内科学系専攻

學位論文題目

急性胃粘膜病変発症時の血管内皮障害発現機構
と予防に関する研究

— 5 lipoxygenase 代謝に対するビタミン E の
役割について —

(主 查)

論文審査委員

教授 豊田 隆 謙 教授 石 森 章

教授 名 倉 宏

論文内容要旨

【目 的】

生体に過剰なストレスが加わると、自律神経の緊張異常を介して、急性胃粘膜病変 (acute gastric mucosal lesion, AGML) が発症する。その成因の一端を担う胃粘膜微小循環における虚血・再灌流 (ischemia-reperfusion) を起点としたフリーラジカル (FR) による血管内皮障害の成立に、ロイコトリエン (LT) や PAF などの chemical mediator (CM) が関与することが注目されている。この LT の産生酵素である 5-lipoxygenase (5-LO) の代謝系をビタミン E (VE) が抑制することが *in vitro* の系で報告されている。しかし *in vivo* において言及する報告はない。本研究は実験的ストレスモデルを用いて AGML 発現に対する VE の役割を抗酸化作用と 5-LO 代謝に対する作用との両側面から検討し、さらに培養血管内皮細胞を用いて内皮-好中球相互反応に及ぼす VE の予防効果及び 5-LO 系に対する作用点を検討することにより、AGML をはじめとする炎症初期における FR や LT などの CM による血管内皮障害発現機構を明らかにすることを目的に施行した。

【対象及び方法】

in vivo : Hartley 系雄性モルモットを control 群と VE 群に分け、VE 群には α -tocopherol を腹腔内投与した後、水浸拘束・熱傷の各ストレスを負荷した。経時的に潰瘍係数 (UI) を計測し、血漿及び胃粘膜の α -tocopherol 濃度を高速液体クロマトグラフィーで、胃粘膜 lipid peroxide (LPO) を八木別法で、FR による血管内皮障害の指標となる extracellular-SOD (EC-SOD) を亜硝酸法で、胃粘膜 sulfidopeptide LT (SP-LT) を RIA にて測定した。さらに病理組織学的に好中球の胃粘膜細静脈内皮への膠着数を計測し、ストレスによる AGML 発現に対する VE の効果を検討した。同時に 5-LO 阻害剤である AA-861 及び SP-LT 拮抗剤である ONO-1078 も投与し各項目に対する効果を検討した。*in vitro* : ヒト臍帯静脈由来の培養血管内皮細胞を単離同定した後、control 群と VE 群に分け、VE 群には α -tocopherol を前投与した後、障害因子として O_2^- の generator である pyrogallol と FMLP, PAF, PMA, ionomycin (Ca ionophore) で刺激した活性化好中球を用いた。内皮細胞障害の指標として細胞内に標識した 3H -adenine の細胞外への specific release (%SR) を算定し、さらに内皮 LPO、内皮-好中球相互作用により産生される SP-LT を測定した。

【結果及び考察】

VEは水浸拘束・熱傷の各ストレスによる潰瘍病変発現に対し、UI、胃粘膜LPOの上昇を有意に抑制した。このことよりVEは、ストレスを誘引としたFRによる胃粘膜障害における組織脂質過酸化反応を抑制すると考えられた。またVEは水浸拘束ストレス後、胃粘膜細静脈内皮細胞への好中球の膠着を抑制し、さらに同ストレス後より早い時相で、血管内皮障害の指標であるEC-SODの上昇を有意に抑制したことから、VEは血管内皮障害を起点とした内皮-好中球相互作用におけるCMの発動を抑制していると考えられた。またVEはストレス後の胃粘膜SP-LTの上昇を有意に抑制したことから、VEはin vivoにおいても5-LO系の反応を抑制している可能性が示唆された。しかし血管内皮細胞や胃粘膜固有細胞には5-LOが存在せず、単独ではLTの産生をすることはないため、VEが5-LO系代謝に対しどこで作用しているのか疑問が残る。そこで培養血管内皮細胞を用いin vitroでの検討を行った。VEはpyrogallol及び活性化好中球による細胞障害率(%SR)の上昇を抑制し、内皮細胞LPOの上昇も抑制した。また活性化好中球と内皮細胞の相互反応によりSP-LTが産生され、VEはその上昇を有意に抑制した。SP-LTの産生機序として5-LOを持つ好中球より産生されたLTA₄が内皮細胞に取り込まれ、内皮に存在するglutathione-S-transferaseによりLTC₄やLTD₄などのSP-LTに変換されると考えられ、VEは内皮に直接働き、glutathione-S-transferaseを抑制している可能性が示唆された。この事実はVEの作用機序の一つに、5-LO代謝における好中球-内皮の相互作用の抑制という新しい機序をあたえるものとして意義深い。以上の実験結果及び文献的考察より、AGML発症時の血管内皮障害発現の機序として次のことが考えられた。すなわち虚血・再灌流によりX-XOD系を介した活性酸素種により内皮が障害されると、LPOが生成されると共に、PAFなどのCMが発動する。ここへ好中球が遊走され内皮へ膠着しNADPH系を介した活性酸素種が産生されると同時に、内皮-好中球相互作用によりLTが産生され、そのLTは内皮を直接障害すると共に、内皮からのPAFの産生を促す。これらの相乗効果により次々と好中球が活性化され炎症反応が増悪して行く。VEはAGMLをはじめとする炎症初期において、FRによる血管内皮障害、内皮-好中球相互作用をめぐるLTなどのCMの発動を各相で抑制すると考えられ、この応用により血管内皮障害を起点とする種々の病態の解明及び新しい治療への展開につながる可能性があると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究はストレスによる急性胃粘膜病変発症の際、胃粘膜局所微小循環における虚血再灌流により派生したフリーラジカルに深く関与する血管内皮細胞レベルでの障害発現機構及びその予防についての解明を命題としている。特に障害増強因子となるケミカルメディエーターのひとつのロイコトリエン (LT) の産生機構や、内皮障害予防に関わるビタミン E の作用機序を多方面から検討を加えている。ビタミン E は生体膜における脂質過酸化反応を抑制することにより抗酸化作用を示すと考えられているが、近年新しい作用として LT 産生酵素である 5-lipoxygenase を抑制することが *in vitro* の系で報告されている。筆者はこの作用に注目し *in vivo* での応用を試みている。モルモットストレス潰瘍モデルを用い、ビタミン E 投与により、まず肉眼的潰瘍病変の抑制、胃粘膜過酸化脂質の上昇が抑制されることを示している。次にフリーラジカルによる血管内皮障害の指標となる EC-SOD 活性上昇の抑制、光顕レベルで内皮細胞への好中球の膠着が抑制されることを示し、ビタミン E が急性胃粘膜病変発症の際に脂質過酸化反応のみでなく、血管内皮障害をも抑制していると指摘している。またビタミン E が胃粘膜 sulfi-dopeptide LT (SP-LT) の上昇を抑制することを示し、*in vivo* においてもビタミン E が 5-lipoxygenase 抑制作用を有すると推察している。しかし筆者は生体内での 5-lipoxygenase の存在様式から胃粘膜における SP-LT の産生源及び、その抑制に働くビタミン E の作用点についても不明な点が残るとし、第二の実験系として培養血管内皮細胞を用いて *in vitro* での検討をしている。ビタミン E が pyrogallol や活性化好中球由来のフリーラジカルによる内皮細胞障害を抑制することを、³H-adenine の特異的漏出率の測定と位相差顕微鏡による形態的变化を用いて示している。さらに活性化好中球で刺激した内皮細胞からの SP-LT の上昇もビタミン E が抑制したことを示している。SP-LT の産生源として好中球由来の LTA₄ が内皮細胞に取り込まれ、内皮細胞内で glutathione-S-transferase により SP-LT に変換されることを文献的に考察を加えた上で、筆者は SP-LT 産生過程においてビタミン E は内皮細胞に働き glutathione-S-transferase を抑制している可能性を指摘している。

本研究における Neues としては、*in vivo* においてビタミン E が 5-lipoxygenase 系を抑制した事実を示した点と、その作用部位としてビタミン E が内皮細胞に存在する SP-LT への変換酵素である glutathione-S-transferase を抑制している可能性を示唆した点が挙げられる。

以上より本論文は目的及び方法を明確にし、多岐にわたる成績を残し、二項目の Neues となる点を示しており、博士論文として評価に値する。